

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 11 月 7 日 (07.11.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/088335 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 5/08, 15/09, G01N 33/50, 33/15, A61K 35/39, A61P 1/18, C12Q 1/68, 1/02
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒541-0044 大阪府 大阪市 中央区伏見町四丁目 2 番 1 4 号 藤村 大和生命ビル Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/04084
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2002 年 4 月 24 日 (24.04.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2001-126315 2001 年 4 月 24 日 (24.04.2001) JP
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒104-8315 東京都 中央区 京橋一丁目 1 5 番 1 号 Tokyo (JP).

- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 谷口 英樹 (TANIGUCHI, Hideki) [JP/JP]; 〒300-1217 茨城県 牛久市 さくら台 3-1 3-1 4 Ibaraki (JP). 鈴木 淳史 (SUZUKI, Atsushi) [JP/JP]; 〒376-0041 群馬県 桐生市 川内町 2-3 0 3-7 Gunma (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: STEM CELLS AND METHOD OF SEPARATING THE SAME

(54) 発明の名称: 幹細胞及びその分離方法

(57) Abstract: A method of separating pancreatic stem cells from mammalian pancreas; a method of identifying mammalian pancreatic stem cells; and use of the pancreatic stem cells thus separated and identified. More specifically, a method of separating mammalian pancreatic stem cells and a method of identifying the same involving the step of analyzing the expression state of at least two marker proteins selected from the group consisting of c-Met, c-Kit, CD45, TER119 and Flk-1 or genes encoding the same.

(57) 要約:

本発明は、哺乳動物の膵臓から膵臓幹細胞を分離する方法及び哺乳動物の膵臓幹細胞を同定する方法、ならびに当該方法により分離、同定され得る膵臓幹細胞の用途を提供する。より詳細には、本発明は、c-Met、c-Kit、CD45、TER119 及び Flk-1 からなる群より選択される 2 以上のマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子の発現状況を解析することを含む、哺乳動物の膵臓幹細胞の分離方法ならびに同定方法を提供する。



WO 02/088335 A1

## 明細書

## 幹細胞及びその分離方法

## 技術分野

本発明は、哺乳動物の膵臓幹細胞及びその分離・同定方法、ならびに当該細胞  
5 の用途に関する。

## 背景技術

マウス胎児の肝臓より [c-Ki t<sup>-</sup>、CD49 f<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、  
TER119<sup>-</sup>] をマーカーとして肝前駆細胞を分離する方法 (Hepatology 32(6),  
1230-1239 (2000)) や [c-Me t<sup>+</sup>、CD49 f<sup>+</sup>/low、c-Ki t<sup>-</sup>、C  
10 D45<sup>-</sup>、TER119<sup>-</sup>] をマーカーとして肝臓幹細胞を分離する方法 (谷口英  
樹: 第117回日本医学会シンポジウム「幹細胞と細胞療法」記録集、80-89 (20  
01)) が報告されている。臓器固有の幹細胞が存在すると考えられているが、幹細  
胞に共通するマーカーの存在は予想されていなかった。特に多種多様に分化し、多  
岐にわたって生理学的機能を発揮する膵臓の幹細胞についてはその分離・同定方法  
15 が確立されていないのが現状である。

## 発明の開示

本発明の目的は、膵臓幹細胞の分離ならびに同定方法を提供することにある。  
さらに本発明の別の目的は、膵臓幹細胞の提供と、当該幹細胞の医薬及び/又は試  
薬としての提供にある。

20 本発明者らは、上記目的を達成するため鋭意検討した結果、[c-Me t<sup>+</sup>、c  
-Ki t<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、TER119<sup>-</sup>] という膵臓幹細胞に共通するマーカーの  
発現様式を見出し、当該特徴を利用して膵臓幹細胞を好適に分離、同定することに  
成功した。またさらに詳細に検討を重ねた結果、[c-Me t<sup>+</sup>、c-Ki t<sup>-</sup>、C  
D45<sup>-</sup>、TER119<sup>-</sup>、Flk-1<sup>-</sup>] というマーカーの発現様式を指標とし、  
25 膵臓幹細胞をさらに好適に分離、同定できることを見出し、本発明を完成するに至  
った。すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) c-Me t、c-Ki t、CD45及びTER119からなる群より選択さ

れるマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子に特異的親和性を有する物質を2種以上用いて哺乳動物の脾臓から脾臓幹細胞を分離する方法。

- (2) c-Met、c-Kit、CD45、TER119及びFlk-1からなる群より選択されるマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子に特異的親和性を有する物質を2種以上用いて哺乳動物の脾臓から脾臓幹細胞を分離する方法。

(3) 特異的親和性を有する物質がマーカー蛋白質の抗体である上記(1)又は(2)に記載の方法。

- (4) c-Met、c-Kit、CD45及びTER119からなる群より選択されるマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子に特異的親和性を有する物質を2種以上用いて哺乳動物の脾臓幹細胞を同定する方法。

(5) c-Met、c-Kit、CD45、TER119及びFlk-1からなる群より選択されるマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子に特異的親和性を有する物質を2種以上用いて哺乳動物の脾臓幹細胞を同定する方法。

- (6) 特異的親和性を有する物質がマーカー蛋白質の抗体である上記(4)又は(5)に記載の方法。

(7) c-Met、c-Kit、CD45及びTER119からなる群より選択される2以上のマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子の発現状況を解析する工程を含む哺乳動物の脾臓から脾臓幹細胞を分離する方法。

- (8) c-Met、c-Kit、CD45、TER119及びFlk-1からなる群より選択される2以上のマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子の発現状況を解析する工程を含む哺乳動物の脾臓から脾臓幹細胞を分離する方法。

(9) c-Met、c-Kit、CD45及びTER119からなる群より選択される2以上のマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子の発現状況を解析する工程を含む哺乳動物の脾臓幹細胞を同定する方法。

- (10) c-Met、c-Kit、CD45、TER119及びFlk-1からなる群より選択される2以上のマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子の発現状況を解析する工程を含む哺乳動物の脾臓幹細胞を同定する方法。

(11) 上記(1)、(2)、(7)又は(8)のいずれかに記載の方法によって哺乳動物の脾臓から分離され得る脾臓幹細胞。

(12) c-Met、c-Kit、CD45及びTER119の4つのマーカーをc-Met<sup>+</sup>、c-Kit<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、TER119<sup>-</sup>のパターンで呈する上記

5 (11)記載の脾臓幹細胞。

(13) c-Met、c-Kit、CD45、TER119及びFlk-1の5つのマーカーをc-Met<sup>+</sup>、c-Kit<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、TER119<sup>-</sup>、Flk-1<sup>-</sup>のパターンで呈する上記(11)記載の脾臓幹細胞。

10 (14) 上記(12)又は(13)記載の脾臓幹細胞又は当該幹細胞から分化した細胞を含む、脾臓の機能低下疾患の予防・治療剤。

(15) 上記(12)又は(13)記載の脾臓幹細胞又は当該幹細胞から分化した細胞を含む、肝・胆管又は胃・腸の機能低下疾患の予防・治療剤。

(16) 哺乳動物の脾臓幹細胞の分化を誘導する物質をスクリーニングするための方法であって、以下の工程を含む方法：

15 (i) 脾臓幹細胞と被検物質とを反応させる工程、

(ii) 反応後の細胞について脾臓マーカーの発現を測定する工程。

(17) 哺乳動物の肝・胆管又は胃・腸への分化を誘導する物質をスクリーニングするための方法であって、以下の工程を含む方法：

(i) 上記(12)又は(13)記載の脾臓幹細胞と被検物質とを反応させる工程、

20 (ii) 反応後の細胞について肝・胆管又は胃・腸マーカーの発現を測定する工程。

(18) 哺乳動物の脾臓機能調節物質をスクリーニングするための方法であって、以下の工程を含む方法：

(i) 脾臓幹細胞又は当該幹細胞から分化した細胞と被検物質とを反応させる工程、

(ii) 反応後の細胞について脾臓マーカーの発現を測定する工程。

25 (19) 哺乳動物の肝・胆管又は胃・腸機能調節物質をスクリーニングするための方法であって、以下の工程を含む方法：

(i) 上記(12)又は(13)記載の脾臓幹細胞又は当該幹細胞から分化した細胞

と被検物質とを反応させる工程、

(ii)反応後の細胞について肝・胆管又は胃・腸マーカーの発現を測定する工程。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、c-Met、c-Kit、CD45及びTER119からなる群より  
5 選択される2以上、好ましくは3以上、最も好ましくは4つ全てのマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子とそれぞれ特異的親和性を有する物質を用いて、哺乳動物の脾臓から脾臓幹細胞を分離、同定する方法を提供する。

さらに本発明は、c-Met、c-Kit、CD45、TER119及びFlk-1  
10 以上、最も好ましくは5つ全てのマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子とそれぞれ特異的親和性を有する物質を用いて、哺乳動物の脾臓から脾臓幹細胞を分離、同定する方法を提供する。

本明細書において「哺乳動物」とは、具体的にはヒトをはじめウシ、ウマ、イヌ、モルモット、マウス、ラット等が挙げられる。

15 c-Met蛋白質は、プロトオンコジーン産物であり、チロシンキナーゼ活性を有する肝細胞増殖因子受容体(HGFレセプター)として働く。その発現と胃や胆道等における癌との関連性が報告されている。c-Kit蛋白質も同様なプロトオンコジーン産物で、マクロファージコロニー刺激因子あるいは血小板由来増殖因子に対するレセプターと同様の構造を持ったレセプターチロシンキナーゼであり、  
20 ある種の腫瘍に関係していることが報告されている。CD45蛋白質は、白血球共通抗原の1種で、赤血球、血小板及びそれらの前駆細胞を除く、すべての造血性細胞に発現していることが知られている。TER119蛋白質は、赤血球系細胞を選別するための有効な細胞表面マーカーであることが知られている。Flk-1蛋白質は、血管内皮細胞を選別するための有効な細胞表面マーカーであることが知られ  
25 ている。本発明はこれらの蛋白質又はそれらをコードする遺伝子が脾臓幹細胞において特有の発現様式を示すという新たな知見に基づいている。本明細書中、「マーカー」とは特にことわりのない限り、このような脾臓幹細胞に特有な発現様式を示

す一連の蛋白質又はそれをコードする遺伝子から構成される群の各々を意味する。かかるマーカー蛋白質は哺乳動物の種類等によってそのアミノ酸配列が異なる場合があり、本発明においてはその脾臓幹細胞における発現様式が同じである限り、そのような蛋白質もマーカー蛋白質として使用することができ、本発明の範囲内である。具体的には、それぞれの蛋白質についてアミノ酸配列で40%以上の相同性を有するホモログも本発明のマーカー蛋白質、すなわちc-Met、c-Kit、CD45、TER119及びFli-1として用いることができる。本発明はこれらのマーカー蛋白質及び／又はそれらをコードする遺伝子の発現を、各マーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子と特異的な親和性を有する物質を用いて解析する工程を含む。

本明細書中、「用いて」という用語について、その方法は特に限定されず、具体的には、例えばマーカー蛋白質に特異的親和性を有する物質を用いる場合であれば該マーカー蛋白質の抗体との抗原抗体反応を利用する方法が挙げられ、又、マーカー蛋白質をコードする遺伝子に特異的親和性を有する物質を用いる場合であればハイブリダイゼーション反応を利用する方法が挙げられる（詳細な手順については後述する）。

マーカー蛋白質と特異的な親和性を有する物質としては例えば当該蛋白質に特異的親和性を有する抗体又はその断片が挙げられ、その特異的親和性とは抗原抗体反応により該蛋白質を特異的に認識し、結合する能力のことである。該抗体又はその断片は、当該蛋白質と特異的に結合可能なものであれば特に限定されず、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体及びそれらの機能的断片のいずれであってもよい。これらの抗体あるいはその機能的断片は、通常当分野で行なわれている方法によって製せられる。例えばポリクローナル抗体を用いる場合であれば、該蛋白質をマウスやウサギといった動物の背部皮下あるいは腹腔内あるいは静脈等に注射して免疫し、抗体価が上昇するのを待った後に抗血清を採取する方法が挙げられ、またモノクローナル抗体を用いる場合であれば、常法に従いハイブリドーマを作製して、その分泌液を採取する方法が挙げられる。抗体断片を製造する方法としてはク

ローニングした抗体遺伝子断片を微生物等に発現させる方法がよく用いられている。当該抗体、抗体断片等の純度は、当該蛋白質との特異的親和性を保持している限り、特に限定されない。これらの抗体又はその断片は、蛍光物質、酵素やラジオアイソトープ等で標識されていてもよい。さらに、これらは市販されているものを用いても良い。

5 マーカー蛋白質をコードする遺伝子と特異的親和性を有する物質としては、例えば当該遺伝子に特異的親和性を有するオリゴ又はポリヌクレオチドプローブ（以下、便宜上単にプローブともいう）、ならびにオリゴ又はポリヌクレオチドプライマー対（以下、便宜上単にプライマー対ともいう）が挙げられ、その「特異的親和性」とは、目的の遺伝子にのみハイブリダイズする性質を意味し、従って当該遺伝子の全部もしくは一部に完全相補的なものか、もしくは上記性質を満たす範囲で1乃至数個のミスマッチを含んでいてもよい。該プローブ、プライマー対は、当該遺伝子に特異的親和性を有するものであれば特に限定されないが、例えば当該遺伝子の塩基配列の全部もしくは一部、ならびにそれらの相補配列を含むオリゴ又はポリヌクレオチド等が挙げられ、検出すべき遺伝子の形態に応じて適宜選択する。当該オリゴ又はポリヌクレオチドは当該遺伝子との特異的親和性を有している限りはその由来は特に限定されず、合成されたものであっても、当該遺伝子から必要な部分を切り出し、通常行なわれる方法によって精製されたものであってもよい。これらのオリゴ又はポリヌクレオチドは、蛍光物質、酵素やラジオアイソトープ等で標識されていてもよい。

20 本発明の脾臓幹細胞の分離又は同定方法は、上記5つのマーカー蛋白質又はそれらをコードする遺伝子にそれぞれ特異的親和性を有する物質5種のうち、少なくとも2つ、好ましくは3つ、さらに好ましくは4つ、最も好ましくは5つ全てを用いて、少なくとも2つ、好ましくは3つ、さらに好ましくは4つ、最も好ましくは5つ全てのマーカーを解析することにより実施される。かかる解析により [c-Met 発現、c-Kit 非発現、CD45 非発現、TER119 非発現、Flk-1 非発現]（[c-Met<sup>+</sup>、c-Kit<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、TER119<sup>-</sup>、Flk-1

「 $-$ 」とも記載される) という特徴のうち、少なくとも2つ、好ましくは3つ、さらに好ましくは4つ、最も好ましくは5つを満たす細胞を分離することによって、哺乳動物由来の膵臓幹細胞を得ることができる。かかる幹細胞は、 $[c-Met^+, c-Kit^-, CD45^-, TER119^-, Flk-1^-]$  マーカーを呈する。ここで「呈する」とは、それぞれのマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子を「発現している」あるいは「発現していない」という特徴を有していることを意味する。

各特異的親和性を有する物質を用いて、それぞれのマーカーを呈する細胞を選別、分離する方法は、通常、当分野で行われている方法及びそれらを組み合わせた方法が用いられる。例えば、蛋白質レベルでマーカーを解析する場合、特に細胞を生きた状態で回収する必要がある場合には、当該物質を標識するための色素を適宜選択して、フローサイトメトリーを利用する方法が好都合である。より好適には、蛍光活性化セルソーター (FACS: fluorescence-activated cell sorter) を用いて、細胞を分離する。当該装置を用いることにより、目的とする細胞を自動で分離、回収することができる。

同定する場合等、生細胞としての回収が特に必要でない場合には、細胞を破碎し抽出してmRNAを回収し、ノザンブロットを行ってもよいし、また膜蛋白質を抽出してウェスタンブロットを行うこともできる。

また、遺伝子発現を指標として幹細胞を分離する手法として、例えば  $c-Met$  プロモーターで GFP (green fluorescent protein) 遺伝子を発現させ、FACSで分離する工程が利用できる。当該工程 ( $c-Met$  発現細胞の分離、同定) は、他のマーカーの発現を指標とする方法と組み合わせることによって、より効果的な幹細胞の分離、同定手段となる。

本発明においては、本発明の分離方法ならびに同定方法を用いて、哺乳動物の膵臓幹細胞を得、又、確認することができる。かかる幹細胞は、適当な条件下で分化を誘導することにより種々の生理学的機能を有する細胞へと分化する (以下、このように分化誘導を受け生理学的機能を発揮するようになった細胞を、便宜上、機能細胞と称する)。ここで「適当な条件下」とは、肝細胞成長因子 (hepatocyte g



rowth factor, HGF) 及び上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) 等のサイトカインを添加した培養条件下にあることを意味する。例えば膵臓幹細胞は、グルカゴン産生細胞である  $\alpha$  細胞、インスリン産生細胞である  $\beta$  細胞、膵ポリペプチド産生細胞である  $\gamma$  細胞、ソマトスタチン産生細胞である  $\delta$  細胞、エキソクリン細胞等に分化することが知られており、かかる分化は、それらの細胞が発現、分泌する生理活性物質の有無を調べることにより確認することができる。

本発明によれば、幹細胞を安定して供給することができるので、ひいては当該幹細胞から分化した細胞をも所望の時期に所望の量、提供することができる。例えば、膵臓幹細胞から分化した細胞を膵臓機能低下疾患患者の体内に移植することにより膵臓機能を回復させ、膵臓機能低下疾患に治療的効果を奏することが期待できる。膵臓機能低下疾患としては、糖尿病、慢性膵炎、自己免疫性膵炎、膵摘出後に見られる膵臓の機能障害等が挙げられる。また、本発明の膵臓幹細胞から分化した細胞は、肝・胆管又は胃・腸マーカーを発現することから、膵臓幹細胞から分化した細胞を肝・胆管又は胃・腸機能低下疾患患者の体内に移植することにより肝・胆管または胃・腸機能を回復させ、肝・胆管又は胃・腸機能低下疾患に治療的効果を奏することも期待できる。肝・胆管機能低下疾患としては、急性肝炎、慢性肝炎、代謝性肝疾患等、胃・腸機能低下疾患としては、短腸症候群、炎症性腸疾患、胃摘出後に見られる胃の機能障害等が挙げられる。

本発明はさらに、本発明の膵臓幹細胞を用いて、膵臓幹細胞の分化を誘導する物質をスクリーニングする方法を提供する。当該方法は少なくとも以下の工程を含む。

(1) 膵臓幹細胞と被検物質とを反応させる工程。

(2) 反応後の細胞について膵臓マーカーの発現を測定する工程。

本スクリーニング方法で使用する膵臓幹細胞は、膵臓の機能細胞へと分化する細胞であれば特に限定されず、好ましくは上述の本発明の方法で分離された膵臓幹細胞である。該幹細胞と被検物質との反応は、所望とする分化の種類、分化誘導条件等に応じて適宜設定されるが、通常、35～40℃、数分～数十日、好ましくは、

36. 5～37. 5℃、8～30日間培養する。被検物質との反応後、該幹細胞の分化の有無、状況を調べる。

幹細胞が分化したか否かは、その膵臓マーカーの発現を測定することにより確認することができる。当該マーカーは所望とする機能細胞によって適宜選択される。

- 5   ここで膵臓マーカーとは、膵臓特異的、特に膵臓の機能細胞に特異的に発現、産生（分泌）している蛋白質又はそれをコードする遺伝子であって、例えば  $\alpha$  細胞への分化誘導能を調べる場合にはグルカゴンの産生及び分泌を、 $\beta$  細胞への分化誘導能を調べる場合にはインスリンの産生及び分泌を調べることにより確認できる。

- 10   本発明はさらに、本発明の膵臓幹細胞又はそれから分化誘導される機能細胞を用いて、膵臓の機能を調節する物質をスクリーニングする方法を提供する。当該方法は少なくとも以下の工程を含む。

- (1) 膵臓幹細胞又は当該幹細胞から分化した細胞と被検物質とを反応させる工程。
- (2) 反応後の細胞について膵臓マーカーの発現を測定する工程。

- 15   本スクリーニング方法で使用する膵臓幹細胞及びそれから分化した機能細胞は、膵臓の機能細胞へと分化する細胞及びそれから分化誘導を受けた細胞であれば特に限定されず、好ましくは上述の本発明の方法で分離された膵臓幹細胞ならびにそれから適当な条件下（上述）で分化した細胞である。スクリーニングは、例えば具体的には以下のようにして実施される。膵臓幹細胞の培養系に被検物質を添加し、8～30日間培養後に分化誘導される機能細胞における遺伝子あるいは蛋白質（マ
- 20   ーカー）の発現解析を行うことにより、当該被検物質の膵臓機能細胞の分化や増殖における役割に関して解析（定量的PCR、ノザンブロッティング、免疫染色、ELISA等）する。

- 25   本発明のスクリーニング方法においてその対象となる被検物質としては、既知もしくは未知の種々の物質が挙げられ、具体的には既知のサイトカイン、細胞外マトリクス、無機化合物あるいは適当な細胞培養株の培養上清や適当なcDNAライブラリーより得た未知の遺伝子又はその組換え蛋白質等が例示される。

本発明はさらに、本発明の膵臓幹細胞を用いて、肝・胆管又は胃・腸への分化

を誘導する物質をスクリーニングする方法を提供する。当該方法は少なくとも以下の工程を含む。

(1) 本発明の膵臓幹細胞と被検物質とを反応させる工程。

(2) 反応後の細胞について肝・胆管又は胃・腸マーカーの発現を測定する工程。

- 5     該幹細胞と被検物質との反応は、所望とする分化の種類、分化誘導条件等に応じて適宜設定されるが、通常、35～40℃、数分～数十日、好ましくは、36.5～37.5℃、8～30日間培養する。被検物質との反応後、該幹細胞の分化の有無、状況を調べる。

- 幹細胞が分化したか否かは、その肝・胆管又は胃・腸マーカーの発現を測定することにより確認することができる。当該マーカーは所望とする機能細胞によって適宜選択される。ここで肝・胆管又は胃・腸マーカーとは、肝・胆管又は胃・腸特異的、特に肝・胆管又は胃・腸の機能細胞に特異的に発現、産生（分泌）している蛋白質又はそれをコードする遺伝子であり、例えば、肝・胆管細胞マーカーとしては、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン、グルコース-6-ホスファターゼ、トランスチレチン (transferrin)、サイトケラチン19、サイトケラチン18、サイトケラチン8、biliary glycoprotein 又はそれをコードする遺伝子が、胃・腸細胞マーカーとしては、fabp-2、GIP、CCK、TPH、ペプシノーゲンF、ガストリン又はそれをコードする遺伝子が挙げられる。
- 10
- 15

- 本発明はさらに、本発明の膵臓幹細胞又はそれから分化誘導される機能細胞を用いて、肝・胆管又は胃・腸の機能を調節する物質をスクリーニングする方法を提供する。当該方法は少なくとも以下の工程を含む。
- 20

(1) 本発明の膵臓幹細胞又は当該幹細胞から分化した細胞と被検物質とを反応させる工程。

(2) 反応後の細胞について肝・胆管又は胃・腸マーカーの発現を測定する工程。

- 25     スクリーニングは、例えば具体的には以下のようにして実施される。膵臓幹細胞の培養系に被検物質を添加し、8～30日間培養後に分化誘導される機能細胞における遺伝子あるいは蛋白質（マーカー）の発現解析を行うことにより、当該被検

物質の膵機能細胞の分化や増殖における役割に関して解析（定量的PCR、ノザンブロットィング、免疫染色、ELISA等）する。

本発明のスクリーニング方法においてその対象となる被検物質としては、既知もしくは未知の種々の物質が挙げられ、具体的には既知のサイトカイン、細胞外マトリクス、無機化合物あるいは適当な細胞培養株の培養上清や適当なcDNAライブラリーより得た未知の遺伝子又はその組換え蛋白質等が例示される。

このようなスクリーニング方法により得られた膵臓幹細胞の分化誘導物質、肝・胆管又は胃・腸への分化誘導物質、膵臓機能調節物質、あるいは肝・胆管又は胃・腸機能調節物質は膵臓機能低下疾患、肝・胆管機能低下疾患、および胃・腸機能低下疾患の治療薬として有用である。ここで膵臓機能低下疾患、肝・胆管機能低下疾患、および胃・腸機能低下疾患とは上述のとおりである。

本発明の膵臓幹細胞又は当該幹細胞から分化した細胞を含む薬剤（以下、本発明の薬剤ともいう）は、ヒトをはじめサル、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、ウマ、ウシ等種々の哺乳動物における膵臓機能低下疾患、肝・胆管機能低下疾患、および胃・腸機能低下疾患の予防・治療に有効である。その投与量は、当該疾患の処置に必要な量であれば特に限定されないが、そのような処置を必要とする対象の、種、年齢、性別、体重等の条件や症状によって変化する。

本発明の薬剤はまた、例えば、錠剤、ベレット、トローチ、カプセル、坐剤、クリーム、軟膏、エアゾール、吸入用粉末剤、液剤、乳剤、懸濁剤、その他の使用に適した剤形に用いられる慣用の製薬上許容される実質的に無毒性の担体又は賦形剤を配合することができる。さらに、必要に応じて助剤、安定化剤、増粘剤、着色料、および香料などの添加物を配合することもできる。

本発明の薬剤は、当該分野で公知の製剤技術を用いて製造することができる。本発明の薬剤はまた、必要に応じ、当該分野で公知の方法を用いてプロドラッグにすることもできる。

#### 実施例

以下、本発明を実施例にて具体的且つ詳細に説明するが、本発明はこれらに何

ら限定されるものではない。

#### 実施例 1

##### 脾臓細胞の回収

C57BL/6 マウス新生児 (生後 1 日目) から実体顕微鏡下で脾臓を摘出し、  
5 0.05% コラゲナーゼと 5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  (pH 7.4) を含む  $\text{Ca}^{2+}$ -free のハンクス液 (Hank's balanced salt solution) 中に入れた。これを 37℃  
で 10 分間インキュベートした後、穏やかにピペッティングすることにより細胞を  
単離し、細胞培養液にて 3 回洗浄した。調製後、トリパンプルーによる検定では、  
80% 以上の細胞が生存していた。細胞培養液としては以下の組成のものを独自に  
10 調製し用いた。

##### (細胞培養液の調製)

DMEM と F-12 の 1 : 1 混合液に、ウシ胎児血清 (FBS, 10%)、 $\gamma$ -  
インスリン ( $1 \mu\text{g/mL}$ )、デキサメタゾン ( $1 \times 10^{-7} \text{M}$ )、ニコチンアミド  
(10 mM)、L-グルタミン (2 mM)、 $\beta$ -メルカプトエタノール ( $50 \mu\text{M}$ )、  
15 HEPES (5 mM) 及びペニシリン/ストレプトマイシンを加えて調製した。

##### フローサイトメトリー

まず、調製した細胞をビオチン化抗 CD45 モノクローナル抗体 (PharMingen,  
San Jose, CA)、ビオチン化抗 TER119 モノクローナル抗体 (PharMingen, S  
an Jose, CA)、及び抗 c-Met モノクローナル抗体 (Upstate biotechnology,  
20 Lake Placid, NY) と氷中にて 30 分間反応させた。反応後 staining medium (3%  
FBS を含む PBS (phosphate-buffered saline)) にて 3 回細胞を洗浄し、続い  
て FITC (fluorescein isothiocyanate) で標識した抗マウス IgG2a モノク  
ローナル抗体 (PharMingen, San Jose, CA)、APC (allophycocyanin) で標識し  
た抗 c-Kit モノクローナル抗体 (PharMingen, San Jose, CA)、及びテキサス  
25 レッドで標識したストレプトアビジン (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) と氷中に  
て 30 分間反応させた。最後に staining medium にて細胞を 3 回洗浄し、PI (p  
ropidium iodide) ( $5 \mu\text{g/mL}$ ) を含む staining medium 中に細胞を懸濁した。

これら蛍光標識された細胞をFACS-vantageにて解析し、各々の画分に分離した。ゲートの設定はネガティブコントロールを指標にして行った。

#### 細胞の回収

- まず、CD45<sup>-</sup>、TER119<sup>-</sup>細胞にゲートをかけ、CD45<sup>+</sup>細胞及びTER119<sup>+</sup>細胞を除いた。この操作により血液細胞が除去される。次にCD45<sup>-</sup>、TER119<sup>-</sup>細胞をc-Met<sup>+</sup>/c-Kit<sup>-</sup>、c-Met<sup>-</sup>/c-Kit<sup>+</sup>、c-Met<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup>及びc-Met<sup>-</sup>/c-Kit<sup>-</sup>細胞画分に画分化し、細胞の回収ゲートを設定した。続いて、回収された細胞を直径35mmの組織培養ディッシュ上に200細胞/cm<sup>2</sup>の濃度で播種し、低密度培養を行った。残存する赤血球、細胞の残骸、2個以上の細胞が凝集した細胞塊、及び死細胞は、前方散乱光 (forward scatter)、側方散乱光 (side scatter) 及びPIにより除いた。回収後、トリパンブルーによる検定では、90%以上の細胞が生存していた。

#### In Vitroにおけるコロニーアッセイ

- FACSにより回収した細胞を上記の細胞培養液にて培養した (37℃、5% CO<sub>2</sub>)。培養開始から24時間後に、ヒト組換え肝細胞成長因子 (rHGF) (50 ng/mL; Sigma) と上皮成長因子 (EGF) (20 ng/mL; Sigma) を添加した。コロニー数は培養開始から8日目に測定した。

#### RT-PCR

- 14日間培養したコロニーにクローニングリングをかぶせ、その中にISOGENを加え穏やかにピペッティングすることで、コロニー形成細胞からRNAを得た。続いて、得られたRNAから逆転写酵素 (Super Script II) を用いてcDNAを作成した。次に、作成したcDNAを鋳型として、以下のプライマーを用いてPCRを行い、各種臓器機能細胞のマーカーの検出を試みた。

目的とするマーカーならびにそのプライマーを表1に示す。

- 表1に記載の各プライマーは、北海道システム・サイエンス株式会社に発注し合成されたものを用いた。

PCRサイクルは、95℃ (4分間) → [94℃ (1分間) → 56℃ (1分間)]

→72℃(1分間)]×45サイクル→72℃(10分間)である。PCRにより  
産生された核酸は、2%アガロースゲルにて展開し、解析した。

#### 免疫染色

培養14日目に形成されたコロニーをPBSで3回洗浄し、メタノールで固定  
5 (−20℃、10分間)後、Tween20(0.05%)を含むPBS(PBS  
−Tween20)にて3回洗浄した。10%サル血清にてブロッキング後、ヤギ  
抗インスリン抗体もしくはマウス抗グルカゴン抗体と反応(4℃、16時間)させ  
た。PBS−Tween20にて3回洗浄した後に再度ブロッキングを行い、続い  
てAlexa 488標識化サル抗ヤギIgG抗体もしくはCy3標識化サル抗  
10 マウスIgG抗体とそれぞれ反応させた(4℃、3時間)。最後にPBS−Twe  
en20にて3回洗浄した後に、Zeiss LSM510 レーザー走査型顕微  
鏡にて観察、解析した。

#### 結果

マウス新生児より調製した膵臓細胞を、FACSを用いてまず生細胞(約8  
15 0%)にゲートをかけ、次にCD45とTER119のそれぞれに対する抗体を用  
いて展開し、非血球細胞画分である[CD45<sup>−</sup>、TER119<sup>−</sup>]細胞画分(全  
体の約40%)を明らかにした。続いて、[CD45<sup>−</sup>、TER119<sup>−</sup>]細胞をc  
−Met(HGF受容体)とc−Kit(SCF受容体)のそれぞれに対する抗体  
でさらに展開した。[c−Met<sup>+</sup>、c−Kit<sup>+</sup>、CD45<sup>−</sup>、TER119<sup>−</sup>]細  
20 胞は全体の細胞の約0.01%であり、[c−Met<sup>+</sup>、c−Kit<sup>−</sup>、CD45<sup>−</sup>、  
TER119<sup>−</sup>]細胞は全体の細胞の約1.0%であり、[c−Met<sup>−</sup>、c−Ki  
t<sup>+</sup>、CD45<sup>−</sup>、TER119<sup>−</sup>]細胞は全体の細胞の約0.8%であり、[c−M  
et<sup>−</sup>、c−Kit<sup>−</sup>、CD45<sup>−</sup>、TER119<sup>−</sup>]細胞は全体の細胞の約36%  
であった。各々の画分中に含まれる細胞を生きたままの状態で、回収、培養し(2  
25 00細胞/cm<sup>2</sup>)、インビトロにおけるコロニーアッセイを行った。回収された細  
胞のいくつかは高い増殖能を示し、単一細胞由来のクローン性コロニーを形成する。  
培養8日目の観察において、形態学的に異なった細胞より形成されるコロニーが主

に2種類観察された。上皮性の細胞により形成されるコロニーを epithelial colony、線維芽細胞様のコロニーを fibroblast-like colony と命名した。これら異なるコロニーより別々に cDNA を作成し、PCR により各種膵機能細胞のマーカーの検出を行った。その結果、epithelial colony においてのみインスリンやグルカゴンといった膵機能細胞のマーカーが検出された。従って、epithelial colony 形成細胞 (epithelial colony-forming cell: ECFC) の中に膵幹/前駆細胞が含まれることが強く示唆された。ECFC の数を数えた結果、ECFC が [c-Met<sup>+</sup>、c-Kit<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、TER119<sup>-</sup>] 細胞画分中に限定して且つ高頻度に含まれることが明らかとなった(ゲートかけていない細胞に比べて13.1倍、

5 [CD45<sup>-</sup>、TER119<sup>-</sup>] 細胞画分に比べて9.45倍)。

10

次に、これらの ECFC が膵幹/前駆細胞の特徴の一つである多分化能を有するか否かを RT-PCR 法と免疫染色法にて解析した。RT-PCR 法にて合計30個のクローン性コロニーを解析した結果、これらコロニー中には、グルカゴン産生細胞である  $\alpha$  細胞、インスリン産生細胞である  $\beta$  細胞、膵ポリペプチド産生細胞

15 である  $\gamma$  細胞、ソマトスタチン産生細胞である  $\delta$  細胞の全て、もしくはそれらのうちのいくつかを含んだコロニーが多数存在し、さらにエキソクリン細胞のマーカーであるアミラーゼやリパーゼを発現する細胞を含むコロニーも多数見られた。免疫染色法を用いた場合も同様に、同一コロニー内にグルカゴン産生細胞である  $\alpha$  細胞とインスリン産生細胞である  $\beta$  細胞が混在することが確認された。これらの結果から、膵幹/前駆細胞の持つ重要な性質の一つである多分化能を有した細胞 (ECFC) は、マウス新生児膵臓細胞中のわずか1%を占めるに過ぎない [c-Met<sup>+</sup>、c-Kit<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、TER119<sup>-</sup>] 細胞画分中に高頻度に濃縮されることが判明した。さらに、これらの細胞は、FACS を用いて生きたまま分離、回収可能であることも同時に明らかになった。

20

## 25 実施例 2

### 膵臓細胞の回収

実施例 1 と同様な方法で膵臓細胞を回収した。また、細胞培養液は実施例 1 と



同じものを用いた。

#### フローサイトメトリー

実施例1で用いた各種標識抗体や標識試薬に加え、PE (phycoerythrin) で標識した抗Flk-1モノクローナル抗体 (PharMingen, San Jose, CA) も用いた以外は、実施例1と同様な方法で行った。

#### 細胞の回収

実施例1と同様にして得られた [c-Met<sup>+</sup>, c-Kit<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, TER119<sup>-</sup>] 細胞をさらに、Flk-1陽性の細胞と陰性の細胞とに画分化した以外は、実施例1と同様な方法で行った。

#### 10 In Vitroにおけるコロニーアッセイ

実施例1と同様な方法で行った。

#### RT-PCR

実施例1と同様な方法で行った。

#### 免疫染色

15 実施例1と同様な方法で行った。

#### 結果

実施例1で得られた [c-Met<sup>+</sup>, c-Kit<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, TER119<sup>-</sup>] 細胞をFlk-1陽性と陰性の細胞に画分化した。[c-Met<sup>+</sup>, c-Kit<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, TER119<sup>-</sup>, Flk-1<sup>-</sup>] 細胞は全体の細胞 (回収した全脾臓細胞) の約0.7%であり、[c-Met<sup>+</sup>, c-Kit<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, TER119<sup>-</sup>, Flk-1<sup>+</sup>] 細胞は全体の細胞の約0.3%であった。実施例1と同様にしてECFCの数を数えた結果、ECFCが [c-Met<sup>+</sup>, c-Kit<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, TER119<sup>-</sup>] 細胞画分中に比べ [c-Met<sup>+</sup>, c-Kit<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, TER119<sup>-</sup>, Flk-1<sup>-</sup>] 細胞画分中にさらに限定され且つ高頻度に含まれることが明らかとなった (ゲートをかけていない細胞に比べて19.7倍、[CD45<sup>-</sup>, TER119<sup>-</sup>] 細胞画分に比べて14.1倍)。

次に、これらのECFCが脾幹/前駆細胞の特徴の一つである多分化能を有す

るか否かを実施例 1 と同様に R T - P C R 法と免疫染色法にて解析した。その結果、  
臍幹／前駆細胞の持つ重要な性質の一つである多分化能を有した細胞 (E C F C)  
は、マウス新生児臍臓細胞中のわずか 0.7 % を占めるに過ぎない [ $c-Met^+$ 、  
 $c-Kit^-$ 、 $CD45^-$ 、 $TER119^-$ 、 $F1k-1^-$ ] 細胞画分中に高頻度に  
5 濃縮されることが判明した。さらに、これらの細胞が、F A C S を用いて生きたま  
ま分離、回収可能であることも同時に明らかになった。

### 実施例 3

#### 臍臓細胞の回収

実施例 1 と同様な方法で臍臓細胞を回収した。また、細胞培養液は実施例 1 と  
10 同じものを用いた。

#### フローサイトメトリー

実施例 1 で用いた各種標識抗体や標識試薬に加え、P E (phycoerythrin) で標  
識した抗 F 1 k - 1 モノクローナル抗体 (PharMingen, San Jose, CA) も用いた以  
外は、実施例 1 と同様な方法で行った。

#### 15 細胞の回収

実施例 1 と同様にして得られた [ $c-Met^+$ 、 $c-Kit^-$ 、 $CD45^-$ 、 $TE$   
 $R119^-$ ] 細胞をさらに、F 1 k - 1 陽性の細胞と陰性の細胞とに画分化した以  
外は、実施例 1 と同様な方法で行った。

#### I n V i t r oにおける培養

20 F A C S により回収した細胞を実施例 1 と同じ細胞培養液にて培養した (37℃、  
5%CO<sub>2</sub>)。培養開始から 24 時間後に、ヒト組換え肝細胞成長因子 (r H G F)  
(50 ng/mL ; Sigma) と上皮成長因子 (E G F) (20 ng/mL ; Sigma)  
を添加した。培養開始から 30 日目にフローサイトメトリーによって細胞を単離し、  
それらから形成されるコロニーに含まれる細胞の分化マーカー発現を R T - P C  
25 R で解析した。

#### R T - P C R

実施例 1 と同様な方法で行った。

## 結果

- 5 [c-Met<sup>+</sup>、c-Kit<sup>+</sup>、CD45<sup>+</sup>、TER119<sup>+</sup>、Flk-1<sup>+</sup>] 細胞を30日間培養後、フローサイトメトリーによって単離し、それらから形成されるコロニーに含まれる細胞の分化マーカー発現を解析した結果、種々の膵臓細胞マーカーに加え、肝・胆管細胞マーカーとしての、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン、グルコース-6-ホスファターゼ、トランスチレチン(transsthyretin)、サイトケラチン19、サイトケラチン18、サイトケラチン8、biliary glycoproteinを、胃・腸細胞マーカーとしての、fabp-2、GIP、CCK、TPH、ペプシノーゲンF、ガストリンの発現を認めた。

10

表 1

マーカー		プライマー
$\alpha$ 細胞特異的マーカー	プレプログルカゴン	5'-ATTTACTTTGTGGCTGGATTG-3' (配列番号 1) 5'-TGTCAGTGATCTTGGTTTGAA-3' (配列番号 2)
	プレプロインスリン I	5'-CTGTTGGTGCCTTCCTACC-3' (配列番号 3) 5'-GCAGTAGTTCTCCAGCTGGT-3' (配列番号 4)
$\beta$ 細胞特異的マーカー	プレプロインスリン II	5'-TCAAGCAGCACCTTTGTGGTT-3' (配列番号 5) 5'-GTTGCAGTAGTTCTCCAGCTG-3' (配列番号 6)
	膵ポリペプチド	5'-CTCCCTGTTTCTCGTATCCA-3' (配列番号 7) 5'-AGAGCAGGGAATCAAGCCAA-3' (配列番号 8)
$\delta$ 細胞特異的マーカー	プレプロソマトスタチン	5'-CTCTGCATCGTCCTGGCTT-3' (配列番号 9) 5'-CAGGATGTGAATGTCTTCCAG-3' (配列番号 10)
エキソクリン細胞特異的マーカー	アミラーゼ 2	5'-AGTACCTGTGGAAGTTACCT-3' (配列番号 11) 5'-ACACAAGGGCTCTGTCAGAA-3' (配列番号 12)

	ホルモン感受性リパーゼ	5'-TCTTCTTCGAGGGTGATGAA-3' (配列番号 13) 5'-TACCTTGCTGTCCTGTCCTT-3' (配列番号 14)
その他	i p f 1 / p d x 1	5'-TTACAAGCTCGCTGGGATCAC-3' (配列番号 15) 5'-AGGTCACCGCACAAATCTTGCT-3' (配列番号 16)
	c - m e t	5'-AGCCAGTAATGATCTCAATG-3' (配列番号 17) 5'-TCAGGATAGGGGACAGGT-3' (配列番号 18)
ポジティブ コントロー ル	ヒポキサンチンホスホリ ボシルトランスフェラー ゼ (HPRT)	5'-CTGTAATGATCAGTCAACGGC-3' (配列番号 19) 5'-GGCCTATAGGCTCATAGTGCA-3' (配列番号 20)
肝・胆管細 胞マーカー	アルブミン	5'-CATGACACCATGCCTGCTGAT-3' (配列番号 21) 5'-CTCTGATCTTCAGGAAGTGAC-3' (配列番号 22)
	α-フェトプロテイン	5'-ACTCACCCCAACCTTCCTGTC-3' (配列番号 23) 5'-CAGCAGTGGCTGATACCAGAG-3' (配列番号 24)
	グルコース-6-ホスフ ァターゼ	5'-AACCCATTGTGAGGCCAGAGG-3' (配列番号 25) 5'-TACTCATTACACTAGTTGGTC-3' (配列番号 26)
	トランスチレチン	5'-TGGTATTTGTGTCTGAAGCTG-3' (配列番号 27) 5'-TTAATAAGAATGCTTCACGGC-3' (配列番号 28)
	サイトケラチン 19	5'-GTCCTACAGATTGACAATGC-3' (配列番号 29) 5'-CACGCTCTGGATCTGTGACAG-3' (配列番号 30)
	サイトケラチン 18	5'-GGACCTCAGCAAGATCATGGC-3' (配列番号 31) 5'-CCACGATCTTACGGGTAGTTG-3' (配列番号 32)

	サイトケラチン 8	5'-AGTCTCAGATCTCAGACACG-3' (配列番号 33) 5'-CCATAGGATGAACTCAGTCC-3' (配列番号 34)
	biliary glycoprotein	5'-GAACTAGACTCTGTACCCTG-3' (配列番号 35) 5'-GCCAGACTTCCTGGAATAGA-3' (配列番号 36)
胃・腸細胞 マーカー	腸脂肪酸結合蛋白質 (intestinal fatty acid binding protein; fabp-2)	5'-ATTCGACGGCACGTGGAAAGT-3' (配列番号 37) 5'-AAGAATCGCTTGGCCTCAACT-3' (配列番号 38)
	胃抑制ペプチド (GIP)	Jensen J., Pedersen E. E., Galante P., Hald J., Heller R. S., Ishibashi M., Kageyama R., Guillemot F., Serup P., and Madsen O. D. 2000. Control of endodermal endocrine development by Hes-1. Nat. Genet. 24: 36-44.
	コレシストキニン (CCK)	Jensen et al., <i>supra</i> .
	トリプトファンヒドロキ シラーゼ (TPH)	Jensen et al., <i>supra</i> .
	ペプシノーゲン F	5'-ACCTAGACCTGGTCTACATTG-3' (配列番号 39) 5'-AGTGAAGCTCTCCATGGTAGT-3' (配列番号 40)
	ガストリン	Jensen et al., <i>supra</i> .

#### 産業上の利用可能性

本発明の膵臓幹細胞もしくは当該幹細胞から分化した各種機能細胞は、糖尿病等の膵臓機能低下疾患患者の体内に移植することにより、膵臓機能を回復させ、糖尿病等の治療効果を期待することができる。さらには、肝・胆管又は胃・腸の機能低下疾患の治療効果も期待することができる。

また、当該幹細胞及び／又は機能細胞を用いることにより、膵臓幹細胞の分化を誘導する物質、肝・胆管又は胃・腸への分化を誘導する物質、膵臓機能調節物質、及び肝・胆管又は胃・腸機能調節物質をスクリーニングすることができる。このような物質は膵臓、肝・胆管又は胃・腸機能低下疾患の治療薬として有望である。

本出願は、日本で出願された特願2001-126315を基礎としておりそれらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

配列表フリーテキスト

- 5 配列番号1：プレプログルカゴン ( $\alpha$ 細胞特異的マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。
- 配列番号2：プレプログルカゴン ( $\alpha$ 細胞特異的マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。
- 10 配列番号3：プレプロインスリンI ( $\beta$ 細胞特異的マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。
- 配列番号4：プレプロインスリンI ( $\beta$ 細胞特異的マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。
- 配列番号5：プレプロインスリンII ( $\beta$ 細胞特異的マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。
- 15 配列番号6：プレプロインスリンII ( $\beta$ 細胞特異的マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。
- 配列番号7：臍ポリペプチド ( $\gamma$ 細胞特異的マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。
- 配列番号8：臍ポリペプチド ( $\gamma$ 細胞特異的マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。
- 20 配列番号9：プレプロソマトスタチン ( $\delta$ 細胞特異的マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。
- 配列番号10：プレプロソマトスタチン ( $\delta$ 細胞特異的マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。
- 25 配列番号11：アミラーゼ2 (エキソクリン細胞特異的マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。
- 配列番号12：アミラーゼ2 (エキソクリン細胞特異的マーカー) 遺伝子を検出する

るためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号13：ホルモン感受性リパーゼ（エキソクリン細胞特異的マーカー）遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

- 5 配列番号14：ホルモン感受性リパーゼ（エキソクリン細胞特異的マーカー）遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号15：ipf1/pdx1遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

- 10 配列番号16：ipf1/pdx1遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号17：c-Met遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

- 15 配列番号18：c-Met遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号19：ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT、ポジティブコントロール）遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

- 20 配列番号20：ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT、ポジティブコントロール）遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号21：アルブミン（肝・胆管細胞マーカー）遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

- 25 配列番号22：アルブミン（肝・胆管細胞マーカー）遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号23： $\alpha$ -フェトプロテイン（肝・胆管細胞マーカー）遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号24:  $\alpha$ -フェトプロテイン (肝・胆管細胞マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

5 配列番号25: グルコース-6-ホスファターゼ (肝・胆管細胞マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号26: グルコース-6-ホスファターゼ (肝・胆管細胞マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

10 配列番号27: トランスチレチン (肝・胆管細胞マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号28: トランスチレチン (肝・胆管細胞マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号29: サイトケラチン19 (肝・胆管細胞マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

15 配列番号30: サイトケラチン19 (肝・胆管細胞マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号31: サイトケラチン18 (肝・胆管細胞マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

20 配列番号32: サイトケラチン18 (肝・胆管細胞マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号33: サイトケラチン8 (肝・胆管細胞マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号34: サイトケラチン8 (肝・胆管細胞マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

25 配列番号35: biliary glycoprotein (肝・胆管細胞マーカー) 遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号36: biliary glycoprotein (肝・胆管細胞マーカー) 遺伝子を検出する



ためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号37：腸脂肪酸結合蛋白質（胃・腸細胞マーカー）遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

5 配列番号38：腸脂肪酸結合蛋白質（胃・腸細胞マーカー）遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号39：ペプシノーゲンF（胃・腸細胞マーカー）遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号40：ペプシノーゲンF（胃・腸細胞マーカー）遺伝子を検出するためのPCRプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

10

## 請求の範囲

1. c-Met、c-Kit、CD45及びTER119からなる群より選択されるマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子に特異的親和性を有する物質を2種以上用いて哺乳動物の脾臓から脾臓幹細胞を分離する方法。
- 5 2. c-Met、c-Kit、CD45、TER119及びF1k-1からなる群より選択されるマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子に特異的親和性を有する物質を2種以上用いて哺乳動物の脾臓から脾臓幹細胞を分離する方法。
3. 特異的親和性を有する物質がマーカー蛋白質の抗体である請求項1又は2に記載の方法。
- 10 4. c-Met、c-Kit、CD45及びTER119からなる群より選択されるマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子に特異的親和性を有する物質を2種以上用いて哺乳動物の脾臓幹細胞を同定する方法。
5. c-Met、c-Kit、CD45、TER119及びF1k-1からなる群より選択されるマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子に特異的親和性を有する物質を2種以上用いて哺乳動物の脾臓幹細胞を同定する方法。
- 15 6. 特異的親和性を有する物質がマーカー蛋白質の抗体である請求項4又は5に記載の方法。
7. c-Met、c-Kit、CD45及びTER119からなる群より選択される2以上のマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子の発現状況を解析する工程を含む哺乳動物の脾臓から脾臓幹細胞を分離する方法。
- 20 8. c-Met、c-Kit、CD45、TER119及びF1k-1からなる群より選択される2以上のマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子の発現状況を解析する工程を含む哺乳動物の脾臓から脾臓幹細胞を分離する方法。
9. c-Met、c-Kit、CD45及びTER119からなる群より選択される2以上のマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子の発現状況を解析する工程を含む哺乳動物の脾臓幹細胞を同定する方法。
- 25 10. c-Met、c-Kit、CD45、TER119及びF1k-1からなる

群より選択される2以上のマーカー蛋白質又はそれをコードする遺伝子の発現状況を解析する工程を含む哺乳動物の膵臓幹細胞を同定する方法。

11. 請求項1、2、7又は8のいずれかに記載の方法によって哺乳動物の膵臓から分離され得る膵臓幹細胞。

5 12. c-Met、c-Kit、CD45及びTER119の4つのマーカーをc-Met<sup>+</sup>、c-Kit<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、TER119<sup>-</sup>のパターンで呈する請求項11記載の膵臓幹細胞。

13. c-Met、c-Kit、CD45、TER119及びFlk-1の5つのマーカーをc-Met<sup>+</sup>、c-Kit<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、TER119<sup>-</sup>、Flk-1<sup>-</sup>

10 のパターンで呈する請求項11記載の膵臓幹細胞。

14. 請求項12又は13記載の膵臓幹細胞又は当該幹細胞から分化した細胞を含む、膵臓の機能低下疾患の予防・治療剤。

15. 請求項12又は13記載の膵臓幹細胞又は当該幹細胞から分化した細胞を含む、肝・胆管又は胃・腸の機能低下疾患の予防・治療剤。

16. 哺乳動物の膵臓幹細胞の分化を誘導する物質をスクリーニングするための方法であって、以下の工程を含む方法：

(i)膵臓幹細胞と被検物質とを反応させる工程、

(ii)反応後の細胞について膵臓マーカーの発現を測定する工程。

17. 哺乳動物の肝・胆管又は胃・腸への分化を誘導する物質をスクリーニングするための方法であって、以下の工程を含む方法：

(i)請求項12又は13記載の膵臓幹細胞と被検物質とを反応させる工程、

(ii)反応後の細胞について肝・胆管又は胃・腸マーカーの発現を測定する工程。

18. 哺乳動物の膵臓機能調節物質をスクリーニングするための方法であって、以下の工程を含む方法：

25 (i)膵臓幹細胞又は当該幹細胞から分化した細胞と被検物質とを反応させる工程、

(ii)反応後の細胞について膵臓マーカーの発現を測定する工程。

19. 哺乳動物の肝・胆管又は胃・腸機能調節物質をスクリーニングするための方

法であって、以下の工程を含む方法：

- (i) 請求項 1 2 又は 1 3 記載の膵臓幹細胞又は当該幹細胞から分化した細胞と被検物質とを反応させる工程、
- (ii) 反応後の細胞について肝・胆管又は胃・腸マーカーの発現を測定する工程。

## SEQUENCE LISTING

<110> AJINOMOTO CO., INC.

<120> Stem cell and separating method thereof

<130> 09474

<150> JP 2001-126315

<151> 2001-04-24

<160> 40

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of preproglucagon (alpha cell specific marker) gene

<400> 1

atttactttg tggctggatt g

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of preproglucagon (alpha cell specific marker) gene

<400> 2

tgtcagtgat cttggtttga a

21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of preproinsulin I (beta cell specific marker) gene

<400> 3

ctgttggtgc acttcctacc

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of preproinsulin I (beta cell specific marker) gene

<400> 4

gcagtagttc tccagctggt

20

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of preproinsulin II (beta cell specific marker) gene

<400> 5

tcaagcagca cctttgtggt t

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of preproinsulin II (beta cell specific marker) gene

<400> 6

gttgacagtag ttctccagct g

21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of pancreatic polypeptide (gamma cell specific marker) gene

<400> 7

ctccctgttt ctgtatcca

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of pancreatic polypeptide (gamma cell specific marker) gene

<400> 8

agagcaggga atcaagccaa

20

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of preprosomatostatin (delta cell specific marker) gene

<400> 9

ctctgcatcg tcctggctt

19

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of preprosomatostatin (delta cell specific marker) gene

<400> 10

caggatgtga atgtcttcca g

21

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of amylase 2 (exocrine cell specific marker) gene

<400> 11

agtacctgtg gaagttacct

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of amylase 2 (exocrine cell specific marker) gene

<400> 12

acacaagggc tctgtcagaa

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of hormone-sensitive lipase (exocrine cell specific marker) gene

<400> 13

tctttcttcga gggatgatgaa

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of hormone-sensitive lipase (exocrine cell specific marker) gene

<400> 14

taccttgctg tctgtcctt

20

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of ipf1/pdx1 gene

<400> 15

ttacaagctc gctgggatca c

21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of ipf1/  
pdx1 gene

<400> 16

aggtcaccgc acaatcttgc t

21

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of c-met  
gene

<400> 17

agccagtaat gatctcaatg

20

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of c-met gene

<400> 18

tcaggatagg ggacaggt

18

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT, positive control) gene

<400> 19

ctgtaatgat cagtcaacgg c

21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT, positive control) gene

<400> 20

ggcctatagg ctcatagtgc a

21

<210> 21

<211> 21

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of albumin (hepatocyte/biliary cell marker) gene  
<400> 21  
catgacacca tgcctgctga t 21

<210> 22  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of albumin (hepatocyte/biliary cell marker) gene  
<400> 22  
ctctgatctt caggaagtgt ac 22

<210> 23  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of alpha-fetoprotein (hepatocyte/biliary cell marker) gene  
<400> 23  
actcacccca accttcctgt c 21

<210> 24  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of alpha  
-fetoprotein (hepatocyte/biliary cell marker) gene  
<400> 24

cagcagtggc tgataccaga g

21

<210> 25  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of gluco  
se-6-phosphatase (hepatocyte/biliary cell marker) gene  
<400> 25

aacccattgt gaggccagag g

21

<210> 26  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of gluco

se-6-phosphatase (hepatocyte/biliary cell marker) gene

<400> 26

tactcattac actagttggt c

21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of trans  
thyretin (hepatocyte/biliary cell marker) gene

<400> 27

tggtatttgt gtctgaagct g

21

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of trans  
thyretin (hepatocyte/biliary cell marker) gene

<400> 28

ttaataagaa tgcttcacgg c

21

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of cytok  
eratin 19 (hepatocyte/biliary cell marker) gene

<400> 29

gtcctacaga ttgacaatgc

20

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of cytok  
eratin 19 (hepatocyte/biliary cell marker) gene

<400> 30

cacgctctgg atctgtgaca g

21

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of cytok  
eratin 18 (hepatocyte/biliary cell marker) gene

<400> 31

ggacctcagc aagatcatgg c

21



<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of cytok  
eratin 18 (hepatocyte/biliary cell marker) gene

<400> 32

ccacgatctt acgggtagtt g

21

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of cytok  
eratin 8 (hepatocyte/biliary cell marker) gene

<400> 33

agtctcagat ctcagacacg

20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of cytok  
eratin 8 (hepatocyte/biliary cell marker) gene

<400> 34

ccataggatg aactcagtc

20

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of biliary glycoprotein (hepatocyte/biliary cell marker) gene

<400> 35

gaactagact ctgtcaccct g

21

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of biliary glycoprotein (hepatocyte/biliary cell marker) gene

<400> 36

gccagacttc ctggaataga

20

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of intestinal fatty acid binding protein (fabp-2; gastric cell/enterocyte marker) gene

<400> 37

attcgacggc acgtggaaag t

21

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of intestinal fatty acid binding protein (fabp-2; gastric cell/enterocyte marker) gene

<400> 38

aagaatcgct tgacctcaac t

21

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of pepsinogen F (gastric cell/enterocyte marker) gene

<400> 39

acctagacct ggtctacatt g

21

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer for detection of pepsinogen F (gastric cell/enterocyte marker) gene

<400> 40

agtgaagctc tccatggtag t

21

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. **B7**

PCT/JP02/04084

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N5/08, C12N15/09, G01N33/50, G01N33/15, A61K35/39,  
A61P1/18, C12Q1/68, C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N5/08, C12N15/09, G01N33/50, G01N33/15, A61K35/39,  
A61P1/18, C12Q1/68, C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Luc BOUWENS et al., Islet Morphogenesis and Stem Cell Markers in Rat Pancreas., The Journal of Histochemistry and Cytochemistry (1996), Vol.44, No.9, pages 947 to 951	16,18/ 1-15,17,19
X/A	Henryk ZULEWSKI et al., Multipotential Nestin-Positive Stem Cells Isolated From Adult Pancreatic Islets Differentiate Ex Vivo Into Pancreatic Endocrine, Exocrine, and Hepatic Phenotypes., DIABETES, March.2001, Vol.50, No.3, pages 521 to 533	16,18/ 1-15,17,19
X/A	Eric HUNZIKER et al., Nestin-Expressing Cells in the Pancreatic Islets of Langerhans., Biochemical and Biophysical Research Communications (2000), Vol.271, No.1, pages 116 to 119	16,18/ 1-15,17,19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
29 July, 2002 (29.07.02)

Date of mailing of the international search report  
13 August, 2002 (13.08.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No. **B7**

PCT/JP02/04084

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97/15310 A (Univ Florida Res Found Inc.), 01 May, 1997 (01.05.97), & JP 11-514877 A	1-19

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. **B7**

PCT/JP02/04084

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Pancreatic stem cells and markers thereof had been publicly known as stated in JP 11-514877 A, BIOSIS NO.:200000253457 & Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 271, No. 1, p. 116-119 (2000), BIOSIS NO.:199699197107 & J. Histochem. Cytochem., Vol. 44, NO. 9, p. 947-951 (1996) and so on.

Such being the case, "pancreatic stem cells" per se and markers thereof cannot be considered as a "special technical feature". Thus, the claims have the following three groups of inventions.

(1) Claims 1 to 15, 17 and 19 relating to specific markers such as c-Met.

(2) Claim 16 relating to a method of screening a pancreatic stem cell differentiation inducer. (Continued to extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No. **B7**  
PCT/JP02/04084


Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

(3) Claim 18 relating to a method of screening a pancreatic function controller.



国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/04084

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl <sup>7</sup> C12N5/08, C12N15/09, G01N33/50, G01N33/15, A61K35/39, A61P1/18, C12Q1/68, C12Q1/02		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl <sup>7</sup> C12N5/08, C12N15/09, G01N33/50, G01N33/15, A61K35/39, A61P1/18, C12Q1/68, C12Q1/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	Luc BOUWENS et al., Islet Morphogenesis and Stem Cell Markers in Rat Pancreas., The Journal of Histochemistry and Cytochemistry (1996), Vol. 44, No. 9, p. 947-951	16, 18/ 1-15, 17, 19
X/A	Henryk ZULEWSKI et al., Multipotential Nestin-Positive Stem Cells Isolated From Adult Pancreatic Islets Differentiate Ex Vivo Into Pancreatic Endocrine, Exocrine, and Hepatic Phenotypes., DIABETES, March. 2001, Vol. 50, No. 3, p. 521-533	16, 18/ 1-15, 17, 19
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 29.07.02	国際調査報告の発送日 13.08.02	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一  4B 9162 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	Eric HUNZIKER et al., Nestin-Expressing Cells in the Pancreatic Islets of Langerhans., Biochemical and Biophysical Research Communications (2000), Vol. 271, No. 1, p. 116-119	16, 18/ 1-15, 17, 19
A	WO 97/15310 A (UNIV FLORIDA RES FOUND INC.,) 1997.05.01 & JP 11-514877 A	1 - 19

## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

脾臓幹細胞やそのマーカーは、JP 11-514877 A、BIOSIS NO.: 200000253457 & Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 271, No. 1, P. 116-119 (2000)、BIOSIS NO.: 199699197107 & J. Histochem. Cytochem., Vol. 44, No. 9, P. 947-951 (1996) などにも記載されているように公知である。

そうすると、「脾臓幹細胞」自体やそのマーカーは「特別な技術的特徴」であるとはいえないから、請求の範囲には、

- (1) c-Met 等の特定のマーカーに関する請求の範囲 1-15, 17, 19
  - (2) 脾臓幹細胞の分化を誘導する物質のスクリーニング方法に関する請求の範囲 16
  - (3) 脾臓機能調節物質のスクリーニング方法に関する請求の範囲 18
- の 3 発明が記載されている。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。